

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-198902

(43)Date of publication of application : 06.08.1996

(51)Int.Cl. C08B 37/00
// C12P 19/04
(C12P 19/04
C12R 1:42)
(C12P 19/04
C12R 1:01)

(21)Application number : 07-012126 (71)Applicant : MIZUNO DENICHI
SOMA GENICHIRO
(22)Date of filing : 27.01.1995 (72)Inventor : MIZUNO DENICHI
SOMA GENICHIRO
NISHIZAWA TAKASHI

(54) LOW-MOLECULAR WEIGHT LIPOPOLYSACCHARIDE

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a new low-molecular weight lipopolysaccharide, usable as a medicine and having ultrahigh safety and a high biological activity.

CONSTITUTION: This new low-molecular weight lipopolysaccharide is obtained from a microbial cell and has physicochemical and biological properties of (a) $5,000 \pm 2,000$ molecular weight measured by a sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoretic (SDS-PAGE) method using a protein marker without any recognizable stained band, (b) 1-3 molecules/5,000 molecular weight content of the hexosamine measured by the Elson-Morgan method, (c) 1-3 molecules/5,000 molecular weight content of the 2-keto-3-deoxyoctonate measured by a diphenylamine method and (d) at least 10EU/ng Limulus activity.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 21.03.2000

[Date of sending the examiner's decision of 03.08.2004
rejection]

[Kind of final disposal of application other

than the examiner's decision of rejection or
application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's 2004-18271
decision of rejection]

[Date of requesting appeal against 02.09.2004
examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

A08-198902

* NOTICES *

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] The molecular weight which it was obtained from the microorganism fungus body and measured by the SDS-PAGE method using the following physicochemical property a protein marker of a-c is 5,000**2,000. By the accepting [substantially]-in others-dyeing band b Elson-Morgan method Low-molecular-weight lipopolysaccharide which has that the 2-keto-3-deoxy oct NETO contents measured by the being [the measured hexosamine contents / 1-3 pieces / molecular weight 5,000] c diphenylamine method are 1-3 pieces / molecular weight 5,000.

[Claim 2] It is obtained from a microorganism fungus body and physicochemical [following] and the molecular weight measured by the SDS-PAGE method using the biological property a protein marker of a-f are 5,000**2,000. By the accepting [substantially]-in others-dyeing band b Elson-Morgan method Being [the 2-keto-3-deoxy oct NETO contents measured by the being / the measured hexosamine contents / 1-3 pieces / molecular weight 5,000 / c diphenylamine method / 1-3 pieces / molecular weight 5,000] d rim lath activity Low-molecular-weight lipopolysaccharide which has that a being [a being / they / 10 EU/ng /-at least e protein content / below 1% (weight)] f nucleic-acid content is below 1% (weight).

[Claim 3] Low-molecular-weight lipopolysaccharide given in claim 1 or the term 2 whose microorganism is a gram-negative microorganism.

[Claim 4] A gram-negative microorganism is punt air (Pantoea). Low-molecular-weight lipopolysaccharide according to claim 3 which is a microorganism belonging to the microorganism or the Salmonella (Salmonella) group belonging to a group.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] This invention has a specific physicochemical property and a specific biological property, and safety is related with the new high low-molecular-weight lipopolysaccharide of bioactive very highly (toxicity is low).

[0002]

[Description of the Prior Art] Lipopolysaccharide (lipopolysaccharide.) It is the conjugated compound which consists of the lipid and sugar which exist in the adventitia surrounding the peptidoglycan of gram-negative bacterial cell walls, such as Escherichia coli, a salmonella, and Bordetella pertussis. indicating it as Following LPS -- it is -- The volume [JIE em GYUSEN and on R HAKKEMBEKKU (J. M.Ghuysen and R.Hakenbeck) known as an active ingredient of an O antigen and endotoxin, "New comprehensive biochemistry (New Comprehensive Biochemistry)", The 27th volume, BAKUTE real cel Wall (Bacterial Cell Wall), the 18th page, an ERUSE veer (Elsevea), and 1994]. The basic structure of LPS is the oligosaccharide and pan which are called the lipid A which has a unique lipid, and R core which carried out covalent bond to it from three components of O unique polysaccharide (the "Nikkei biotechnology newest glossary", the 431st page, Nikkei tuna UHIRU, 1985).

[0003] The basic structure of lipid A is common to many strains, and the basic frame consisted of a guru KOSAMINIRU glucosamine of beta-1 and 6 association, and has combined the phosphoric acid at least with the C-1st place and C-4 ' in many cases, respectively. Although each amino group combines 3-hydroxyfatty acid, a hydroxyl group combines several sorts of saturated fatty acid, or hydroxyfatty acid and the peculiar glycolipid is formed, the

class of fatty acid changes somewhat with strains. Although it is an example of a small number of, basic frames completely differ and the example which consists only of 2, 3-diamino -2, and a 3-dideoxy-D-glucose is also reported (the volume on Noma ****, the "49th volume of a medical department study great dictionary", the 82nd page, Kodansha, 1984).

[0004] When the structure of R core is common to the strain of most which belongs to it like Salmonella, The volume [JIE em GYUSEN and on R HAKKEMBEKKU (J. M.Ghuysen and R.Hakenbeck) by which several sorts of partially different structures like Escherichia coli may be known, "New comprehensive biochemistry (New Comprehensive Biochemistry)", The 27th volume, BAKUTE real cel Wall (Bacterial Cell Wall), the 283rd page, an ERUSE veer (Elsevea), and 1994]. Although heptose and 2-keto-3-deoxy oct NETO (it is indicated as Following KDO) are constituents common to many R cores and have generally combined with lipid A through KDO The volume [JIE em GYUSEN and on R HAKKEMBEKKU (J. M.Ghuysen and R.Hakenbeck) by which existence of LPS which lacks either or both sides by the strain is also known, "New comprehensive biochemistry (New Comprehensive Biochemistry)", The 27th volume, BAKUTE real cel Wall (Bacterial Cell Wall), the 294-295th page, an ERUSE veer (Elsevea), and 1994].

[0005] The structure of O unique polysaccharide is the most various in a constituent, is specific to a strain, and shows the activity as the so-called O antigen. Although characterized by the repetitive construct of the oligosaccharide which generally consists of several sorts of monosaccharides, the thing which consists of the same monosaccharide, or the thing which is not a repetitive construct is also known. The biosynthesis of O unique polysaccharide has received rule of a different gene from it of R core. It is possible to permute O unique polysaccharide of the strain which changes with junction or transduction. The volume [JIE em GYUSEN and on R HAKKEMBEKKU (J. M.Ghuysen and R.Hakenbeck) applied to the toxicity of a bacillus, research of a vaccine, etc., "New comprehensive biochemistry (New Comprehensive Biochemistry)", The 27th volume, BAKUTE real cel Wall (Bacterial Cell Wall), the 265-267th page, an ERUSE veer (Elsevea), and 1994].

[0006] Although LPS has very various pharmacological actions, when coincidence is medicated with an antigen and LPS, for example, since an immunoreaction is reinforced, LPS is appointed to a position of a trust as a kind of the adjuvant (adjuvant) which heightens the current vaccine effectiveness (the volume on Homma ****, "bacterial endotoxin", the 312nd page, Kodansha, 1973). Although various LPS is reported conventionally, even if it is LPS generally extracted by what kind of approach, it is 106-107. Having very big molecular weight is known (the volume on Homma ****, "bacterial endotoxin", the 211st page, Kodansha, 1973). Then, LPS with comparatively small molecular weight is also reported. LPS of the molecular weight 8,000**1,000 by SDS-PAGE of the wheat origin or 5,000**2,000, the number 1-4-/molecular weight 8,000 of phosphoric acids, the number of hexosamines 6**2-/molecular weight 8,000, the number of fatty acids 6**2-/molecular weight 8,000, and the KDO number 5**1-/molecular weight 8,000 JP,4-49245,A, JP,4-49243,A, and JP,4-49242,A -- JP,4-49241,A, JP,4-49244,A, JP,4-49240,A, JP,5-155778,A, JP,6-40937,A, the molecular weight 40,000-90,000 by SDS-PAGE of the chlorella origin, the number of phosphoric acids 4**1-/molecular weight 10,000, The number of hexosamines 7**1-/molecular weight 10,000, the number of fatty acids 6**1-/molecular weight 10,000, LPS (JP,4-49245,A --) of the KDO number 2**1-/molecular weight 10,000 JP,4-49243,A, JP,4-49242,A, JP,4-49241,A, JP,4-49244,A, JP,4-49240,A, JP,5-155778,A, JP,6-40937,A, the molecular weight 30,000**5,000 by SDS-PAGE of the Escherichia coli origin, the number 12-/molecular weight 30,000 of phosphoric acids, The number of hexosamines 45**6-/molecular weight 30,000, the number 18-/molecular weight 30,000 of fatty acids, LPS (JP,4-49245,A --) of the KDO number 5**1-/molecular weight 30,000 JP,4-49243,A, JP,4-49242,A, JP,4-49241,A, JP,4-49244,A, JP,4-49240,A, LPS of the molecular weight 6,000**1,000 by SDS-PAGE of the Bordetella pertussis origin or 9,000**1,000, the number 5-/molecular weight 8,000 of phosphoric acids, the number of hexosamines 16**2-/molecular weight 8,000, the number 5-/molecular weight 8,000 of fatty acids, and the KDO number 2**1-/molecular weight 8,000 JP,4-49245,A, JP,4-49243,A, and JP,4-49242,A -- JP,4-49241,A, JP,4-49244,A, JP,4-49240,A, The molecular weight 40,000**10,000 by SDS-PAGE of the Escherichia coli origin or 8,000**4,000, the number 12-/molecular weight 30,000 of phosphoric acids, The number of hexosamines 45**6-/molecular weight 30,000, the number 18-/molecular weight 30,000 of fatty acids, LPS of the KDO number 5**1-/molecular weight 30,000 (JP,6-40937,A), LPS (JP,6-40937,A --) of the molecular weight 5,000**1,000 by SDS-PAGE of the Serratia bacteria origin, the number of phosphoric acids 2**1-/molecular weight 5,000, the number of hexosamines 9**1-/molecular weight 5,000, and the KDO number 2**1-/molecular weight 5,000 JP,5-155778,A

JP,6-65092,A, JP,4-99481,A, JP,6-90745,A, LPS (JP,6-40937,A --) of the 2×10^5 , the number 1-2-/molecular weight 5,000 of phosphoric acids, the number of hexosamines 7×10^1 /molecular weight 5,000, and the 1-2-/molecular weight 5,000 of molecular weight 6,500 KDO numbers by SDS-PAGE of the Enterobacter bacteria origin JP,5-155778,A, JP,6-65092,A, JP,4-99481,A, JP,6-90745,A, LPS (JP,6-40937,A --) of the molecular weight 6,500 2×10^5 by SDS-PAGE of the punt air group bacteria origin, the number of phosphoric acids 2×10^1 /molecular weight 5,000, the number of hexosamines 5×10^1 /molecular weight 5,000, and the KDO number 2×10^1 /molecular weight 5,000 JP,6-65092,A, JP,4-99481,A, JP,6-90745,A, LPS of the molecular weight 6,000 1×10^3 by SDS-PAGE of the Bordetella pertussis origin, the number 4-/molecular weight 6,000 of phosphoric acids, the number 12-/molecular weight 6,000 of hexosamines, and the KDO number 2×10^1 /molecular weight 6,000 (JP,5-155778,A, JP,6-40937,A), LPS of the molecular weight 6,000 1×10^3 by SDS-PAGE of the Bordetella pertussis origin or 9,500 1×10^3 , the number 5-/molecular weight 8,000 of phosphoric acids, the number of hexosamines 16×10^2 /molecular weight 8,000, and the KDO number 2×10^1 /molecular weight 8,000 (JP,4-187640,A), LPS of the molecular weight 5,000 1×10^3 by SDS-PAGE of the Aeromonas hydronalium FIA seed-fungus origin, the number of phosphoric acids 2×10^1 /molecular weight 5,000, the number of hexosamines 9×10^1 /molecular weight 5,000, and the KDO number 0.8×10^0 /molecular weight 5,000 The molecular weight 5,000 by SDS-PAGE of the (JP,6-141849,A) punt air group bacteria origin, the number 2-/molecular weight 5,000 of Lynn, the number 2-/molecular weight 5,000 of hexosamines, 5/molecular weight 5,000 of KDO numbers [biotherapy (BIOTHERAPY), the 6th volume, No. 3, the 357th page, 1992], etc. are reported. As aforementioned, although LPS before and behind molecular weight 5,000 was already reported, while the main dyeing band in these SDS-PAGE was 5,000 or 6,000, the dyeing band equivalent to 30,000 or more molecular weight also existed. That is, LPS before and behind the conventional molecular weight 5,000 was mixture with with a molecular weight of 30,000 or more LPS.

[0007] About the application of LPS, by the artificers of this invention until now An anti-toxoplasma agent (JP,4-492459,A), A cholesterol fall agent (JP,4-49243,A), an anti-herpes agent (JP,4-49242,A), An anti-rheumatism agent (JP,4-49241,A), antidiabetic (JP,4-49244,A), an anti-peptic ulcer agent (JP,4-49240,A) and an immunity functional activator (JP,4-99481,A --) JP,6-141849,A, taking orally and an endermic immunity functional accelerator (JP,4-187640,A), the painkiller (JP,6-40937,A), the growth accelerator (JP,3-155778,A), the anti-withdrawal symptom agent (JP,6-65092,A), etc. are proposed.

[0008] However, conventional LPS is, even if the trouble to the clinical application from the field of safety is pointed out (edited by Japan Tissue Culture Association, "cell growth factor part<>", the 121st page, Asakura Publishing, 1987). On the other hand about the approach of refining LPS from a bacterial cell wall Conventional phenol water extraction [Ore waist foul (O.Westphal) section, MESOZZU Inn carbo hydrate chemistry (Methods in Carbohydrate Chemistry), The 5th volume, the 83rd page, Academic Press (Academic Press), The volume 1965] and on trichloroacetic acid extraction method [A em stub (A. M.Staub), MESOZZU Inn immunology - and - immunochemistry (Methods in Immunology and Immunochemistry), The 1st volume, the 28th page, Academic Press (Academic Press), Although 1967], an EDTA extraction method [Journal of Biological Chemistry (Journal of Biological Chemistry), No. 243, the 6384th page, and 1968], etc. are known Thus, dissociating obtained LPS to with a molecular weight of about about 20,000 subunit further under existence of surface active agents, such as a sodium deoxycholate, is reported (the volume on Homma ****, "bacterial endotoxin", the 229th page, Kodansha, 1973). On the other hand, the with a molecular weight of about 5,000 approach of acquiring only LPS of low molecular weight extremely was not conventionally reported excluding with a molecular weight of 20,000 or more LPS. For example, although drawing of SDS-PAGE is shown, in addition to the dyeing band of the molecular weight 6,000 neighborhood, the with a molecular weight of 30,000 or more dyeing band exists in JP,4-99481,A clearly. Moreover, although the low molecular weight LPS of molecular weight 5,000 or 6,000 was indicated in JP,4-187640,A, JP,4-49240,A, and JP,5-155778,A, these are the preparations refined by each in a heat phenol process and the ion exchange, and the process which eliminates the amount LPS of macromolecules completely was not given, but the amount LPS of macromolecules was intermingled.

[0009]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] As aforementioned, LPS of low molecular weight reported conventionally was the mixture containing the amount LPS of macromolecules, for example, in order to have used clinically as drugs components, such as an immunity functional activator, it was not necessarily satisfactory from the field of safety, or

the field of medicine efficiency ability. .

[0010] This invention is made in view of the situation as above, and aims to let safety offer new LPS which was excellent in bioactive highly (namely, low [toxicity]) as compared with conventional LPS.

[0011]

[Means for Solving the Problem] The artificers of this invention discovered new low molecular weight LPS which is different from LPS reported conventionally as a result of inquiring wholeheartedly, in order to solve the above technical problems, and moreover, this new low molecular weight LPS found out that bioactive was also excellent as compared with conventional LPS very highly [safety] compared with conventional LPS, and they completed this invention.

[0012] Namely, the molecular weight which this invention was obtained from the microorganism fungus body, and was measured by the SDS-PAGE method using the following physicochemical property a protein marker of a-c is 5,000**2,000. By the accepting [substantially]-in others-dyeing band b Elson-Morgan method The low-molecular-weight lipopolysaccharide which has that the 2-keto-3-deoxy oct NETO contents measured by the being [the measured hexosamine contents / 1-3 pieces / molecular weight 5,000] c diphenylamine method are 1-3 pieces / molecular weight 5,000 is offered.

[0013] Furthermore, this invention is obtained from a microorganism fungus body, and physicochemical [following] and the molecular weight measured by the SDS-PAGE method using the biological property a protein marker of a-f are 5,000**2,000. By the accepting [substantially]-in others-dyeing band b Elson-Morgan method Being [the 2-keto-3-deoxy oct NETO contents measured by the being / the measured hexosamine contents / 1-3 pieces / molecular weight 5,000 / c diphenylamine method / 1-3 pieces / molecular weight 5,000] d rim lath activity A being [a being / they / 10 EU/ng /-at least e protein content / 1% or less] f nucleic-acid content also offers the low-molecular-weight lipopolysaccharide which has that it is 1% or less.

[0014] Moreover, the aforementioned microorganism's being a gram-negative microorganism in this invention and also its gram-negative microorganism are punt air (Pantoea). **** is also as a desirable mode by the microorganism belonging to the microorganism or the Salmonella (Salmonella) group belonging to a group. Next, this invention is explained in full detail. In addition, in the following explanation, the display of a percentage is a value by weight, as long as there is no notice especially.

[0015] The low molecular weight LPS of this invention the microorganism belonging to a gram-negative microorganism, for example, the microorganism belonging to a punt air group, or Salmonella etc. An approach well-known from the fungus body which cultivated with the conventional method, collected fungus bodies from the culture medium, and were collected, For example, heat phenol process [Ore waist foul (O.Westphal) editing, MESOZZU Inn carbo hydrate chemistry (Methods in Carbohydrate Chemistry), It extracts more to the 5th volume, the 83rd page, Academic Press (Academic Press), and 1965], and anion exchange resin refines further and it can manufacture. Namely, suspend the fungus body of a microorganism in distilled water, and this suspension is added and agitated into the mixed liquor of distilled water and the heat phenol of the amount of isochore. Subsequently, carry out centrifugal separation, collect water layers, dialyze this water layer, and a phenol is removed. It condenses by the extra **** method, a rough LPS fraction is extracted, the anion-exchange chromatography (for example, mono-Q-sepharose or Q-sepharose is used) of a conventional method refines this fraction, and it desalts with a conventional method.

[0016] Thus, the obtained purification LPS is substantially [as about 6,000 LPS] equal from the molecular weight 5,000 indicated by JP,4-187640,A, JP,4-49240,A, JP,4-99481,A, and JP,5-155778,A. Furthermore, the new low molecular weight LPS of this invention refined by altitude can be obtained by carrying out gel **** of the obtained purification LPS under existence of surfactants, such as a sodium deoxycholate, collecting only the fractions containing low molecular weight LPS, and removing the intermingled amount LPS of macromolecules. The amount LPS of macromolecules which the process of gel **** under this surfactant existence is for refining about 6,000 LPS to altitude further from the molecular weight 5,000 indicated by JP,4-187640,A, JP,4-49240,A, and JP,5-155778,A, and is intermingled according to this process is eliminated completely.

[0017] The new low molecular weight LPS of this invention manufactured by the above approach The molecular weight measured by the SDS-PAGE method using a protein marker is 5,000**2,000 as shown in the example 1 of a trial which carries out a postscript. By the accepting [substantially]-in others-dyeing band b Elson-Morgan method

Being [the 2-keto-3-deoxy oct NETO contents measured by the being / the measured hexosamine contents / 1-3 pieces / molecular weight 5,000 / c diphenylamine method / 1-3 pieces / molecular weight 5,000] d rim lath activity a being [a being / they / 10 EU/ng / -at least e protein content / 1% or less] f nucleic-acid content says that it is 1% or less -- it has a physicochemical and biological property, and has at least 98% of purity. However, depending on the purpose of use, extent of purification can also be made low (for example, 90%).

[0018] The new low molecular weight LPS of this invention can also be used as the drugs which have an immunity functional activation operation, a chemical for animals, etc. Next, the example of a trial is shown and the low molecular weight LPS of this invention is explained in more detail. the example 1 of a trial -- the property that the low molecular weight LPS of this invention is physicochemical and in which this trial is biological is investigated -- it went to accumulate.

1) Low molecular weight LPS and LPS was prepared, respectively by the same approach as the preparation example 1 of a sample, and the example 1 of reference.

2) The measurement low molecular weight LPS and LPS of test-method ** molecular weight was respectively dissolved in distilled water, the solution with a concentration of 2mg [/ml] was prepared, and the 10microg was ****(ed) to 1.5ml ** plastic tube. Apart from this, 10%(w/v) SDS of 180microl, the 5%beta-mercaptoethanol of 45microl, 10micro of SDS processing liquid l which added and prepared the CBB coloring matter solution of 90microl, the 0.5M tris hydrochloric acid (pH6.8) of 112.5microl, and distilled water of 22.5microl It added to said each sample solution, mixed enough, subsequently to under an ebullition water bath, dipped for 5 minutes, and dipped and quenched in iced water immediately after that.

[0019] The migration buffer solution which dissolved 10ml 10%(w/v) SDS, 17.9g fricin, and 3.03g tris in 1l. distilled water, and was prepared was put into the slab-gel-electrophoresis tub (made in Mari Sol). Polyacrylamide gel was fixed to the migration tub 20%, the specimen was put into the sample slot, subsequently to 150V the electrical potential difference was fixed to 50V for 1 hour, and migration was continued until coloring matter was eluted from gel. After migration termination, the argentation kit 161-0443 (Bio-Rad make) performed the argentation at the room temperature, and behavior was checked. ** the quantum hexosamine content of a hexosamine content -- Elson-Morgan (Elson-Morgan) -- the quantum was carried out as follows by law (the edited by Japanese Biochemical Society, a "biochemistry experiment lecture", the 4th volume, the 377-379th page, the 1st edition, the Tokyo Kagaku Dojin publication, 1976). LPS was dissolved in distilled water, the solution with a concentration of 2mg [/ml] was prepared, and the 100microl was ****(ed) to the spitz with a screw cap (Iwaki glass company make), and 8NHCl(s) of 100microl were added to this, it heated at 110 degrees C for 16 hours, about 200microl addition of after 4NNaOH was done, and pH was adjusted to 7. The 100microl was ****(ed), it put into another spitz with a screw cap, the reagent A of 200microl was added, and it heated at 105 degrees C for 1.5 hours, and cooled with the stream. Subsequently, the 100microl was isolated preparatively, 96% ethanol of 670microl was added, the reagent B of 67 moremicrol was added, it was left at the room temperature for 1 hour, and the absorbance in 535nm was measured. As a standard substance for calibration-curve creation, 0-800microg [/ml] N-acetyl glucosamine (Wako Pure Chem make) was used.

Mixed liquor of the acetylacetone of A:75micro of reagents l, and 2.5ml 1.25-N sodium carbonate.

Mixed liquor of p-dimethyl benzaldehyde of B:1.6g of reagents, 30ml concentrated hydrochloric acid, and 30ml 96% ethanol.

** The quantum of the quantum KDO content of a KDO content was carried out as follows by the diphenylamine method [Analytical Biochemistry (Analytical Biochemistry), the 58th volume, No. 1, the 123-129th page, and 1974].

[0020] A 500mg diphenylamine (Wako Pure Chem make), 5ml ethanol (Wako Pure Chem make), a 45ml glacial acetic acid (Wako Pure Chem make), and 50ml concentrated hydrochloric acid (Wako Pure Chem make) were mixed, and the KDO detection reagent was prepared. the water solution of 250microl which contains each sample in the 500microl by the concentration of 0.50mg/ml -- mixing -- under [of 100 degrees C] an ebullition water bath -- it is -- for 30 minutes -- heating -- after -- constant temperature -- the inside of water (24-25 degrees C) -- for 30 minutes -- cooling -- a spectrophotometer (Hitachi make.) 420, 470, and the absorbance in 630 or 650nm were measured with the model U2010 (measured value is respectively indicated to be A420, A470, A630, and A650). As a standard sample, 250micro of KDO ammonium salt (sigma company make) water solutions l of the concentration of 0.5micro mol was used.

[0021] From four sorts of measured value of a specimen sample and a standard sample, S value is calculated by the

formula (1), and it is St about the S value of a specimen sample and a standard sample, respectively. And Ss It carried out. Subsequently, mol number X of KDO was computed by the formula (2).

$$S=A420\cdot A470+A630\cdot A650 \quad (1)$$

$$X=(\text{molecular weight of one mol of } 0.5 \times S_s \times \text{LPS}) / (0.5 \times S_t \times 106) \quad (2)$$

** The measurement rim lath activity of rim lath activity means presenting a positivity by the rim lath test (the volume for Ikuo Suzuki, "the 14th volume of development of drugs, quality control of drugs and the examining method", the 227-243rd page, Hirokawa Publishing, 1990) which is the endotoxin assay using the king crab corpuscle extract and coloring composition substrate which were originated by Levin in 1968, and this rim lath test is known as an LPS detecting method. as a reference standard -- I KORI (E.coli) of 345 pg/EU -- it measured using the TOKISHI color system (Seikagaku make) using 0111:B4.

** The protein content protein content was measured with the Lowry method [Journal of Biological Chemistry (Journal of Biological Chemistry), the 193rd volume, the 65th page, and 1951].

** The quantum of the nucleic-acid content nucleic-acid content was carried out from the measured value (1OD=40microg) in OD (260nm - 300nm).

** Purity purity (%) was computed by the degree type.

[0022] Purity = the result of {desiccation yield - (protein content + nucleic-acid content)} / [desiccation yield] x1003 test-result ** molecular weight determination of molecular weight is as being shown in drawing 1 . Protein and peptide molecular weight marker [94kD which drawing 1 is [kD] an SDS-PAGE migration Fig., and made the lane 1 in drawing migrate to coincidence, 67kD(s), 43kD, 30kD, 20.1kD, 17.2kD, 14.6kD, 14.4kD(s), 8.24kD, 6.38kD, 2.56kD(Pharmacia manufacture)], Lanes 2, 3, and 4 are LPS (20microg, 5microg, and 1.25microg), lanes 5, 6, 7, and 8 are low molecular weight LPS (20microg, 5microg, 1.25microg, and 0.31microg), and the axis of ordinate of drawing shows molecular weight.

[0023] When electrophoresis of the matter which generally has a sugar chain is carried out, when the amount of samples per lane is superfluous, a dyeing band becomes broad, and the molecular weight range of apparent becomes large. Although lanes 5-8 change the amount of the low molecular weight LPS of the same sample and migrate in SDS-PAGE of drawing 1 , the width of face of a dyeing band has spread as the amount of migration of a sample increases. Therefore, the about g amount of 1micro is suitable, and a lane 8 corresponds in order to investigate exact molecular weight. In addition, a lane 2 and a lane 5 make a lot of samples migrate, in order to check existence of LPS of the amount of macromolecules.

[0024] Calculating the molecular weight (it calculating from a lane 8) of low molecular weight LPS from the size marker of a lane 1, the range of 5kDa(s) and a dyeing bandwidth was 7kDa(s) from 4kDa(s) in the central value of a dyeing band. Moreover, on a lane 5, in spite of having made the low molecular weight LPS of 20microg migrate, the amount LPS of macromolecules was not accepted at all like a lane 2. From the above result, the molecular weight of the low molecular weight LPS of this invention is 5,000**2,000, and it became clear that the amount LPS of macromolecules was removed completely.

** The numbers of hexosamines of the low molecular weight LPS of invention of hexosamine ***** were two piece / molecular weight 5,000.

** KDO(s) contained in the low molecular weight LPS of invention of KDO ***** were 2.4 piece / molecular weight 5,000.

** The rim lath activity of the low molecular weight LPS of invention of rim lath ***** was 43.5 EU/ng, on the other hand the rim lath activity of conventional LPS prepared by the same approach as the example 1 of reference was 8.4 EU/ng.

** The protein content of the low molecular weight LPS of invention of protein ***** was 0.68% or less.

** The nucleic-acid content of the low molecular weight LPS of invention of nucleic-acid ***** was 0.50% or less.

** Whenever pure, the purity of the low molecular weight LPS of this invention was 98% or more.

[0025] In addition, although the microorganism and the manufacturing method were changed and examined, the almost same result was obtained. the example 2 of a trial -- this trial investigates the acute toxicity of the low molecular weight LPS of this invention -- it went to accumulate.

(1) The toxicity of LPS prepared by the same approach as preparation and the test-method example 1 of a sample

and the low molecular weight LPS prepared by the same approach and the example 1 of reference was examined using the 7-weeks old C3 H/helium mouse (from a Japanese CHARUSU liver company to purchase). each sample was dissolved in the physiological saline, and per [5.0, 10, and 20] animal and 40 mg/kg appeared in the mouse group which consists of one groups [four] comparatively, and it was medicated with low molecular weight LPS however, 40mg [kg] administration -- into the vein. The life and death of a mouse were observed for after [administration] 72 hours.

(2) a trial result -- the result of this trial is as being shown in Table 1. In intravenous administration, in the low molecular weight LPS of this invention, the example of death of a mouse was not accepted in which dose, but fifty percent lethal dose was 40 or more mg/kg so that clearly from Table 1, but in LPS, total died from the dose of 10 and 20 mg/kg, and fifty percent lethal dose was 6.0 - 8.6 mg/kg. In addition, although the class of microorganism and the manufacturing method of low molecular weight LPS were changed and examined, the almost same result was obtained.

[0026]

[Table 1]

試 料	静 脈 内 投 与			
	投 与 量 (mg/kg)	死亡数	死 亡 率 (%)	LD50
L P S	5	0/4	0	7.1 (6.0-8.6)
	10	4/4	100	
	20	4/4	100	
低分子量 L P S	5	0/4	0	>40
	10	0/4	0	
	20	0/4	0	
	40	0/4	0	

[0027] the example 3 of a trial -- this trial investigates the acute toxicity at the time of prescribing the low molecular weight LPS of this invention for the patient so much more than the example 2 of a trial -- it carried out for accumulating.

(1) Except for having prescribed the same low molecular weight LPS as preparation of a sample, and the example 2 of a test-method trial for the patient into the vein at a rate of per [40 and 80] animal and 160 mg/kg, and having prescribed LPS for the patient into the vein at a rate of per [5.0] animal or 10 mg/kg, it examined by the same approach as the example 2 of a trial.

(2) a trial result -- the result of this trial is as being shown in Table 2. With the dose of 10 mg/kg, 75% died [25%] from the dose of LPS5.0 mg/kg again so that clearly from Table 2. On the other hand, it did not die from the dose of 40 mg/kg in low molecular weight LPS, but 100% died from the dose of 80 and 160 mg/kg. When fifty percent lethal dose is computed from the result of the example 2 of a pre-trial, and this example 3 of a trial, it is as in Table 3. Compared with it of LPS, it was about 8 times the value of fifty percent lethal dose of low molecular weight LPS of this in intravenous administration so that clearly from Table 3.

[0028] Low molecular weight LPS is [0029] it was proved that it is that these results show that a difference of the molecular weight of LPS affects toxicity, and toxicity is very low as compared with conventional LPS. .

[Table 2]

試 料	静 脈 内 投 与			
	投 与 量 (mg/kg)	死亡数	死 亡 率 (%)	LD50
L P S	5	1/4	25	7 (2.5-20)
	10	3/4	75	
低分子量 L P S	40	0/4	0	57 (47-88)
	80	4/4	100	
	160	4/4	100	

[0030]

[Table 3]

試 料	毒性 (LD ₅₀) (mg/kg)
	静 脈 内 投 与
LPS	7.1 (6.8-8.6) 7.0 (2.5-20)
低分子量LPS	57 (47-68)

[0031] the example 4 of a trial -- this trial checks the TNF production effectiveness of the low molecular weight LPS of this invention -- it went to accumulate. the caudal vein of the 7-weeks old male C3 H/helium mouse (it purchases from Charles River Japan, INC.) of each three groups -- per animal -- 0. -- it injected with 0.2ml of physiological salines containing LPS obtained by the same approach as the example 1 of 1, 1.0, or 10microg, and the low molecular weight LPS manufactured by the same approach or the example 1 of reference, and collected blood the 1 hour after, and the blood serum was separated with the conventional method.

[0032] Thus, the TNF activity in each obtained blood serum was measured by the approach based on the toxicity over L929 cell. That is, L929 cell was prepared to the concentration of 8x10⁴ pieces / 100microl by the MEM culture medium which contains fetal calf serum 5%, this was wound around each hole of 96 hole flat bottom plate every [100micro / 1], and it cultivated under 2 hours and 5%CO₂ existence at 37 degrees C. After that, actinomycin-D was added so that it might become in ml and 1microl. /, the blood serum sample or positive control Homo sapiens TNF-alpha (Asahi Chemical Co., Ltd. make) which carried out phase dilution by the MEM culture medium was added every [50micro / 1], and it cultivated on the still more nearly same conditions for 18 hours. After removing a culture medium with an aspirator, it washed by 37-degree C PBS, the dead cell was removed completely, 1% methyl alcohol solution which contains a crystal violet 0.1% was added, and the viable cell was dyed. TNF activity was calculated based on the relation between the dilution ratio of TNF-alpha which measured the absorbance in OD (590nm) as an index, and used whenever [this dyeing] as positive control, and an absorbance.

[0033] The result was as being shown in Table 4. In Table 4, TNF activity is the average of each three groups. The TNF production effectiveness of the low molecular weight LPS of this invention became clear [exceeding it of conventional LPS obtained by the approach of the example 1 of reference] from this result.

[0034]

[Table 4]

試 料	LPS量 (μg/匹)	TNF活性 (単位/ml)
LPS	0.1	0.5
	1.0	2.1
	10	15.2
低分子量LPS	0.1	4.5
	1.0	13.2
	10	28.3

[0035] Example of reference 1 trypton (Difco make) 10g, 5g (Difco make) of yeast extracts, NaCl (Wako Pure Chem industrial company make.) The glucose which added 10g of bests to 1l. of distilled water, adjusted pH to 7.5 by NaOH, sterilized with the autoclave, and sterilized independently (Wako Pure Chem industrial company make.) To the Sakaguchi flask of 500ml ** of 100ml of culture media added at 0.1% of a rate (it is indicated as L-bouillon culture medium below) which entered, a best - Punt air AGUROME lance saved at 80 degrees C (Pantoea agglomerans) A single colony is separated and inoculated from preservation strain. Shaking culture was carried out at 35 degrees C 1 night, and as it was, the whole quantity was inoculated into the Sakaguchi flask of 3 liter capacity containing 1,000ml L-bouillon culture medium, and was cultivated similarly.

[0036] Furthermore, the fungus body cultivated to the table-top-type fur mentor (B.E. MARUBISHI Co., Ltd. make) of 10 liter capacity containing 7l. L-bouillon culture medium was inoculated, on these conditions, aeration culture was carried out, the after harvest was carried out, about 70g wet fungus bodies were collected and cryopreservation of

this was carried out. The heat phenol was added 90 500ml%, and at 65-70 degrees C, it agitated for 20 minutes, and cooled [about 70g of cryopreservation fungus bodies was suspended in 500ml distilled water, and], at-long-intervals alignment processing was carried out at 10,000G and 4 degrees C for 20 minutes, and water layers were collected. The same actuation as the above is repeated for a phenol layer once [further], it dialyzes 1 night, a phenol is removed [2 times of the collected water layers are put together,], and it is extra **** equipment (Advantec Toyo Kaisha, Ltd. make.) about the liquid in dialysis. Extra **** concentration was carried out under the nitrogen gas of two atmospheric pressures with the molecular weight 200,000 cut-off film using UK-200.

[0037] The obtained rough LPS freeze-drying object is dissolved in distilled water, filter sterilization is carried out, the buffer solution is added, and it is an anion-exchange chromatography (Pharmacia manufacture.). It applies to Q-sepharose first flow and is 10mM tris. - The sample solution is dipped in a column with the buffer solution containing NaCl of HCl (pH7.5) and 10mM(s), and they are 200 - 400mMNaCl / 10mM tris. - Elution of the rim lath activity fraction was carried out by HCl (pH7.5). Extra **** of this eluate was carried out on the same conditions as the above, it was desalted and condensed, it freeze-dried and about 300mg purification LPS was obtained from about 70g wet fungus body.

[0038] Hereafter, an example is shown, and about this invention, further, although explained concretely, this invention is not a detail and the thing limited to the following examples.

[0039]

[Example]

Purification LPS100mg obtained by the same approach as the example 1 of example 1 reference by the concentration of 5mg/ml A solubilization buffer-solution [3% sodium deoxycholate (Wako Pure Chem make), It consists of 0.2M sodium chloride, 5mMEDTA-2Na, and a 20mM tris-hydrochloric acid. Dissolve in pH8.3] and it carries out multistory [of the 20ml of the purification LPS solutions] to the upper part of a sephacryl S-200HR column (Pharmacia manufacture) calmly. It consisted of an elution buffer-solution [0.25% sodium deoxycholate (Wako Pure Chem make), 0.2M sodium chloride, 5mMEDTA, and a 10mM tris-hydrochloric acid, and 800ml (50 hours) elution was carried out by the 16ml [o'clock] rate of flow by pH8.3].

[0040] He is a fraction collector (ADVANTEC Co., Ltd. make.) about the eluate obtained while controlling the rate of flow using the peristaltic pump PI (Pharmacia manufacture). Fractionation was carried out by SF2120, 240ml (a part for 24 fractions) of the beginning was discarded, and fractionation was carried out up to 80 fractions in 10ml / fraction after that. The quantum of sugar was performed with the undiluted solution or the diluent about each eluted fraction by the phenol / sulfuric-acid method (the Fukui ****, "the assay of reducing sugar and the 2nd edition", the 50-52nd page, Japan Scientific Societies Press, 1990), and the elution condition was investigated. From the result of the acquired elution condition, SDS-PAGE was performed among the fractionation (fractions 30-60) existence of LPS is expected to be using each fraction 0.5ml of fractions 37-55, and the fractionation pattern of LPS was investigated. Consequently, low molecular weight (molecular weight about 5 kD(s)) LPS was accepted, and since LPS of both a macromolecule daily dose and low molecular weight was accepted, as for the fraction 45-55, the fraction 37-44 refined further the low-molecular-weight LPS fractionation of a fraction 45-55 as follows.

[0041] Each fraction was mixed, and it freeze-dried, and suspended in ethanol, centrifugal separation removed meltable deoxycholic acid to ethanol, and low molecular weight LPS was collected to the insoluble fraction. Ethanol processing of a low-molecular-weight LPS fraction was repeated twice [further], deoxycholic acid was removed, next, it suspended again in ethanol 70%, the buffer-solution component was removed by centrifugal separation, this actuation was repeated further 3 times, and about 20mg of low molecular weight LPS which collected low molecular weight LPS to the insoluble fraction, and freeze-dried and refined it to it was obtained.

Example 2 trypton (Difco make) 5g, 1.6g of potassium dihydrogenphosphates, and 8g of sodium chlorides were dissolved in 1,000ml of purified water, and it sterilized for 15 minutes at 121 degrees C (this is called basal medium below). 10ml of magnesium chloride solutions and 3ml of 0.4% malachite green solutions were added in sterile 40% to 100ml of basal media, and this was made into the magnesium-malachite green culture medium.

[0042] The single colony was separated and inoculated into the Sakaguchi flask of 500ml ** of 100ml of magnesium-malachite green culture media which entered from the Salmonella Minnesota (Salmonella minnesota) preservation strain, shaking culture was carried out at 35 degrees C 1 night, and as it was, the whole quantity was inoculated into the Sakaguchi flask of 3 liter capacity containing a 1.000ml magnesium-malachite green culture

medium, and was cultivated on the same conditions.

[0043] Furthermore, the fungus body cultivated to the table-top-type fermentor (B.E. MARUBISHI Co., Ltd. make) of 10 liter capacity containing a 7l. magnesium-malachite green culture medium was inoculated, on the same conditions, aeration culture was carried out, the after harvest was carried out, about 50g wet fungus bodies were collected, and cryopreservation of this was carried out. The heat phenol was added 90 500ml%, and at 65-70 degrees C, it agitated for 20 minutes, and cooled [about 50g of cryopreservation fungus bodies was suspended in 500ml distilled water, and], at long-intervals alignment processing was carried out at 10,000G and 4 degrees C for 20 minutes, and water layers were collected. The phenol layer was processed by the same actuation as the above once [further]. 2 times of water layers are put together, it dialyzes 1 night, a phenol is removed, and it is extra **** equipment (Advantec Toyo Kaisha, Ltd.) about the liquid in dialysis. Extra **** concentration was carried out under the nitrogen gas of two atmospheric pressures with the molecular weight 200,000 cut-off film using UK-200.

[0044] The obtained rough LPS freeze-drying object is dissolved in distilled water, filter sterilization is carried out, the buffer solution is added, and it is an anion-exchange chromatography (Pharmacia manufacture.). It applies to Q-sepharose first flow and is 10mM tris. - The sample solution is dipped in a column with the buffer solution containing NaCl of HCl (pH7.5) and 10mM(s), and they are 200 - 400mMNaCl / 10mM tris. - Elution of the rim lath activity fraction was carried out by HCl (pH7.5). Extra **** of this eluate was carried out on the same conditions as the above, it was desalted and condensed, it freeze-dried and about 210mg purification LPS was obtained from about 50g wet fungus body.

[0045] It dissolved in the solubilization buffer solution which contains a sodium deoxycholate for this purification LPS80mg 3% by the same approach as an example 1, and developed in the sephacryl S-200HR column (Pharmacia manufacture), the fractions containing low molecular weight LPS were collected, it suspended in ethanol after freeze drying, and centrifugal separation removed buffer-solution components, such as deoxycholic acid, it freeze-dried and the low molecular weight LPS of about 5mg was obtained.

[0046] As a result of measuring the molecular weight, the KDO number, and the number of hexosamines of this low molecular weight LPS by the same approach as said example 1 of a trial, they were 6,000 or 2.01 pieces / molecular weight 6,000, and the 2.8 piece / molecular weight 6,000, respectively. In addition, the SDS-PAGE Fig. of low molecular weight LPS refined by drawing 2 from the Salmonella Minnesota strain is shown for reference. The lane 1 in drawing Protein and peptide marker [94kD, 67kD, 43kD(s), 30kD, 20kD, 17.2kD, 14.6kD, 14.4kD, 8.24kD(s), 6.38kD, and 2.56kD(s)(Pharmacia manufacture)], Lanes 2, 3, and 4 are the purification LPS before gel **** in the formation of sodium deoxycholate existence (20microg, 5microg, and 1.25microg), and its lanes 5, 6, 7, and 8 are low molecular weight LPS (20microg, 5microg, 1.25microg, and 0.31microg).

[0047]

[Effect of the Invention] The high low molecular weight LPS of bioactive is offered very highly [the safety which can be used as drugs etc.] by this invention as explained in detail above.

DESCRIPTION OF DRAWINGS

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] It is the SDS-PAGE Fig. of each LPS sample.

[Drawing 2] It is the SDS-PAGE Fig. of each LPS sample.

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-198902

(43) 公開日 平成8年(1996)8月6日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 8 B 37/00		Z		
// C 1 2 P 19/04		C		
(C 1 2 P 19/04				
C 1 2 R 1:42)				
(C 1 2 P 19/04				

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 11 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平7-12126

(22) 出願日 平成7年(1995)1月27日

(71) 出願人 595013106

水野 傳一

神奈川県鎌倉市岡本1丁目21番20号

(71) 出願人 390025210

柚 源一郎

東京都世田谷区東玉川1-10-21

(72) 発明者 水野 傳一

神奈川県鎌倉市岡本1丁目21番20号

(72) 発明者 柚 源一郎

東京都世田谷区東玉川1丁目10番21号

(72) 発明者 西沢 孝志

東京都北区西ヶ原2丁目35番12号

(74) 代理人 弁理士 西澤 利夫

(54) 【発明の名称】 低分子量リボポリサッカライド

(57) 【要約】

【目的】 医薬品等として使用し得る安全性が極めて高く、かつ生物活性の高い新規な低分子量LPSを提供する。

【構成】 微生物菌体から得られ、a) タンパク質マーカーを用いてSDS-PAGE法で測定した分子量が $5,000 \pm 2,000$ であり、他に染色帯を認めないこと、b) エルソン-モルガン法により測定したヘキソサミン含量が1~3個/分子量 $5,000$ であること、c) ジフェニルアミン法により測定した2-ケト-3-デオキシオクトネート含量が1~3個/分子量 $5,000$ であること、d) リムラス活性が少なくとも 10EU/ng であること、の理化学的および生物学的性質を有する新規な低分子量リボポリサッカライド。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 微生物菌体から得られ、次のa)～c)の理化学的性質

a) タンパク質マーカーを用いてSDS-PAGE法で測定した分子量が5,000±2,000であり、他に染色帯を実質的に認めないこと

b) エルソン-モルガン法により測定したヘキソサミン含量が1～3個/分子量5,000であること

c) ジフェニルアミン法により測定した2-ケト-3-デオキシオクトネート含量が1～3個/分子量5,000であること

を有する低分子量リボポリサッカライド。

【請求項2】 微生物菌体から得られ、次のa)～f)の理化学的および生物学的性質

a) タンパク質マーカーを用いてSDS-PAGE法で測定した分子量が5,000±2,000であり、他に染色帯を実質的に認めないこと

b) エルソン-モルガン法により測定したヘキソサミン含量が1～3個/分子量5,000であること

c) ジフェニルアミン法により測定した2-ケト-3-デオキシオクトネート含量が1～3個/分子量5,000であること

d) リムラス活性が、少なくとも10EU/ngであること

e) タンパク質含量が、1%（重量）以下であること

f) 核酸含量が、1%（重量）以下であること

を有する低分子量リボポリサッカライド。

【請求項3】 微生物が、グラム陰性微生物である請求項1または項2に記載の低分子量リボポリサッカライド。

【請求項4】 グラム陰性微生物が、パントエア(Pantoea)属に属する微生物またはサルモネラ(Salmonella)属に属する微生物である請求項3に記載の低分子量リボポリサッカライド。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】この発明は、特定の理化学的性質および生物学的性質を有し、安全性が極めて高く（毒性が低い）、かつ生物活性の高い新規な低分子量リボポリサッカライドに関するものである。

【0002】

【従来の技術】リボポリサッカライド(lipopolysaccharide。以下LPSと記載することがある)は、大腸菌、サルモネラ菌、百日咳菌等のグラム陰性細菌細胞壁のペプチドグリカンをつむ外膜に存在している脂質および糖からなる複合化合物であり、O抗原およびエンドトキシンの活性成分として知られている[ジェー・エム・ギューセンおよびアール・ハッケンベック(J.M. Chuysen and R. Hakenbeck) 編、「ニュー・コンプリヘンシブ・バイオケミストリー(New Comprehensive Biochemistr

y)」、第27巻、バクテリアル・セル・ウォール(Bacterial Cell Wall)、第18ページ、エルセヴィア(Elsevier)、1994年]。LPSの基本構造は、特異な脂質を有するリビドA、それに共有結合したRコアと呼ばれるオリゴ糖、さらにO特異多糖の3成分よりなっている(「日経バイオテクノロジー最新用語辞典」、第431ページ、日経マグローヒル社、1985年)。

【0003】リビドAの基本構造は多くの菌種に共通であり、基本骨格はβ-1,6結合のグルコサミニル・グルコサミンからなりC-1位およびC-4'位にそれぞれリン酸を結合している場合が多い。各アミノ基は3-ヒドロキシ脂肪酸を、水酸基は数種の飽和脂肪酸またはヒドロキシ脂肪酸を結合し、独特の糖脂質を形成しているが、脂肪酸の種類は菌種によって多少異なっている。少数例であるが基本骨格が全く異なり、2,3-ジアミノ-2,3-ジデオキシ-D-グルコースのみからなる例も報告されている(野間惟道編、「医科学大辞典第49巻」、第82ページ、講談社、1984年)。

【0004】Rコアの構造はサルモネラ属のようにそれに属する大部分の菌種に共通である場合と、大腸菌のように部分的に異なる数種の構造が知られている場合とがある[ジェー・エム・ギューセンおよびアール・ハッケンベック(J.M. Chuysen and R. Hakenbeck) 編、「ニュー・コンプリヘンシブ・バイオケミストリー(New Comprehensive Biochemistry)」、第27巻、バクテリアル・セル・ウォール(Bacterial Cell Wall)、第283ページ、エルセヴィア(Elsevier)、1994年]。一般にヘプトースと2-ケト-3-デオキシオクトネート(以下KDOと記載する)が多くのRコアに共通の構成成分であり、KDOを介してリビドAと結合しているが、菌種によっていずれか一方または双方が欠如しているLPSの存在も知られている[ジェー・エム・ギューセンおよびアール・ハッケンベック(J.M. Chuysen and R. Hakenbeck) 編、「ニュー・コンプリヘンシブ・バイオケミストリー(New Comprehensive Biochemistry)」、第27巻、バクテリアル・セル・ウォール(Bacterial Cell Wall)、第294～295ページ、エルセヴィア(Elsevier)、1994年]。

【0005】O特異多糖の構造は、構成成分の中で最も多様であり、菌種に特異的であって、いわゆるO抗原としての活性を示す。一般に数種の単糖からなるオリゴ糖の繰返し構造を特徴とするが、同一単糖からなるもの、または繰返し構造でないものも知られている。O特異多糖の生合成はRコアのそれとは異なる遺伝子の支配を受けており、接合または形質導入により異なる菌種のO特異多糖を置換することが可能であり、菌の毒力およびワクチンの研究等に応用されている[ジェー・エム・ギューセンおよびアール・ハッケンベック(J.M. Chuysen and R. Hakenbeck) 編、「ニュー・コンプリヘンシブ・バイオケミストリー(New Comprehensive Biochemistr

Y)」、第27巻、バクテリアル・セル・ウオール(Bacterial Cell Wall)、第265～267ページ、エルセヴィア(Elsevier)、1994年]。

【0006】LPSは極めて多様な薬理作用を有しているが、例えば抗原およびLPSを同時に投与した場合、免疫反応が増強されることから、LPSは現在ワクチン効果を高める補助剤（アジュバント）の一種として重用されている（本間遜他編、「細菌内毒素」、第312ページ、講談社、1973年）。従来、多種多様なLPSが報告されているが、一般にどのような方法で抽出したLPSであっても、 $10^6 \sim 10^7$ の極めて大きな分子量を有することが知られている（本間遜他編、「細菌内毒素」、第211ページ、講談社、1973年）。その後、比較的分子量の小さいLPSも報告され、小麦由来のSDS-PAGEによる分子量 $8,000 \pm 1,000$ または $5,000 \pm 2,000$ 、リン酸数 $1 \sim 4$ / 分子量 $8,000$ 、ヘキソサミン数 6 ± 2 / 分子量 $8,000$ 、脂肪酸数 6 ± 2 / 分子量 $8,000$ 、KDO数 5 ± 1 / 分子量 $8,000$ のLPS（特開平4-49245号公報、特開平4-49243号公報、特開平4-49242号公報、特開平4-49241号公報、特開平4-49244号公報、特開平4-49240号公報、特開平5-155778号公報、特開平6-40937号公報）、クロレラ由来のSDS-PAGEによる分子量 $40,000 \sim 90,000$ 、リン酸数 4 ± 1 / 分子量1万、ヘキソサミン数 7 ± 1 / 分子量1万、脂肪酸数 6 ± 1 / 分子量1万、KDO数 2 ± 1 / 分子量1万のLPS（特開平4-49245号公報、特開平4-49243号公報、特開平4-49242号公報、特開平4-49241号公報、特開平4-49244号公報、特開平4-49240号公報、特開平5-155778号公報、特開平6-40937号公報）、大腸菌由来のSDS-PAGEによる分子量 $30,000 \pm 5,000$ 、リン酸数 12 / 分子量3万、ヘキソサミン数 45 ± 6 / 分子量3万、脂肪酸数 18 / 分子量3万、KDO数 5 ± 1 / 分子量3万のLPS（特開平4-49245号公報、特開平4-49243号公報、特開平4-49242号公報、特開平4-49241号公報、特開平4-49244号公報、特開平4-49240号公報）、百日咳菌由来のSDS-PAGEによる分子量 $6,000 \pm 1,000$ または $9,000 \pm 1,000$ 、リン酸数 5 / 分子量 $8,000$ 、ヘキソサミン数 16 ± 2 / 分子量 $8,000$ 、脂肪酸数 5 / 分子量 $8,000$ 、KDO数 2 ± 1 / 分子量 $8,000$ のLPS（特開平4-49245号公報、特開平4-49243号公報、特開平4-49242号公報、特開平4-49241号公報、特開平4-49244号公報、特開平4-49240号公報）、大腸菌由来のSDS-PAGEによる分子量 $40,000 \pm 10,000$ または $8,000 \pm 4,000$ 、リン酸数 12 / 分子量3万、ヘキソサミン数 45 ± 6 / 分子量3万、脂肪酸数 18 / 分子量3万、KDO数 5 ± 1 / 分子量3万のLPS（特開平4-49245号公報、特開平4-49243号公報、特開平4-49242号公報、特開平4-49241号公報、特開平4-49244号公報、特開平4-49240号公報）。

6/分子量3万、脂肪酸数18/分子量3万、KDO数 5 ± 1 /分子量3万のLPS (特開平6-40937号公報)、セラチア属細菌由来のSDS-PAGEによる分子量5,000 \pm 1,000、リン酸数 2 ± 1 /分子量5,000、ヘキソサミン数 9 ± 1 /分子量5,000、KDO数 2 ± 1 /分子量5,000のLPS (特開平6-40937号公報、特開平5-155778号公報、特開平6-65092号公報、特開平4-99481号公報、特開平6-90745号公報)、エンテロバクター属細菌由来のSDS-PAGEによる分子量6,500 \pm 2,500、リン酸数1~2/分子量5,000、ヘキソサミン数 7 ± 1 /分子量5,000、KDO数1~2/分子量5,000のLPS (特開平6-40937号公報、特開平5-155778号公報、特開平6-65092号公報、特開平4-99481号公報、特開平6-90745号公報)、バントエア属細菌由来のSDS-PAGEによる分子量6,500 \pm 2,500、リン酸数 2 ± 1 /分子量5,000、ヘキソサミン数 5 ± 1 /分子量5,000、KDO数 2 ± 1 /分子量5,000のLPS (特開平6-40937号公報、特開平6-65092号公報、特開平4-99481号公報、特開平6-90745号公報)、百日咳菌由来のSDS-PAGEによる分子量6,000 \pm 1,000、リン酸数4/分子量6,000、ヘキソサミン数12/分子量6,000、KDO数 2 ± 1 /分子量6,000のLPS (特開平5-155778号公報、特開平6-40937号公報)、百日咳菌由来のSDS-PAGEによる分子量6,000 \pm 1,000または9,500 \pm 1,500、リン酸数5/分子量8,000、ヘキソサミン数 16 ± 2 /分子量8,000、KDO数 2 ± 1 /分子量8,000のLPS (特開平4-187640)、アエロモナス・ヒドロフィア種菌由来のSDS-PAGEによる分子量5,000 \pm 1,500、リン酸数 2 ± 1 /分子量5,000、ヘキソサミン数 9 ± 1 /分子量5,000、KDO数 0.8 ± 0.5 /分子量5,000のLPS (特開平6-141849号公報)、バントエア属細菌由来のSDS-PAGEによる分子量5,000、リン酸数2/分子量5,000、ヘキソサミン数2/分子量5,000、KDO数5/分子量5,000 [バイオセラピー(BIOTHERAPY)、第6巻、第3号、第357ページ、1992年] 等が報告されている。前記のとおり分子量5,000前後のLPSは、既に報告されているが、これらのSDS-PAGEにおける主染色帯が、5,000または6,000であると同時に、分子量3万以上に相当する染色帯も存在していたのである。即ち、従来の分子量5,000前後のLPSは分子量3万以上のLPSとの混合物であった。

【0007】LPSの用途についてはこの発明の発明者らにより、これまでに抗トキソプラズマ剤（特開平4-492459号参照）、抗マラリア剤（特開平4-492459号参照）、抗カンジダ菌剤（特開平4-492459号参照）として知られている。

4-49243号公報)、抗ヘルペス剤(特開平4-49242号公報)、抗リュウマチ剤(特開平4-49241号公報)、抗糖尿病剤(特開平4-49244号公報)、抗消化性潰瘍剤(特開平4-49240号公報)、免疫機能活性化剤(特開平4-99481号公報、特開平6-141849号公報)、経口・経皮免疫機能促進剤(特開平4-187640号公報)、鎮痛剤(特開平6-40937号公報)、発育促進剤(特開平3-155778号公報)、抗禁断症状剤(特開平6-65092号公報)等が提案されている。

【0008】しかしながら、従来のLPSは、安全性の面から、臨床応用への問題点が指摘されている(日本組織培養学会編、「細胞成長因子part◆」、第121ページ、朝倉書店、1987年)。一方、細菌の細胞壁からLPSを精製する方法については、従来フェノール-水抽出法[オー・ウエストファール(O. Westphal)編、メソッズ・イン・カーボハイドレート・ケミストリー(Methods in Carbohydrate Chemistry)、第5巻、第83ページ、アカデミック・プレス(Academic Press)、1965年]、トリクロロ酢酸抽出法[エー・エム・スタブ(A.M. Staub)編、メソッズ・イン・イムノロジー・アンド・イムノケミストリー(Methods in Immunology and Immunochemistry)、第1巻、第28ページ、アカデミック・プレス(Academic Press)、1967年]、EDTA抽出法[ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(Journal of Biological Chemistry)、第243号、第6384ページ、1968年]等が知られているが、このようにして得られたLPSは、デオキシコール酸ナトリウム等の界面活性剤の存在下で、更に分子量約20,000程度のサブユニットに解離することが報告されている(本間遜他編、「細菌内毒素」、第229ページ、講談社、1973年)。一方、分子量20,000以上のLPSを含まず、分子量5,000程度の極めて低分子量のLPSのみを取得する方法については、従来報告されていなかった。例えば特開平4-99481号公報には、SDS-PAGEの図が示されているが、分子量6,000付近の染色帯に加えて、分子量30,000以上の染色帯が明らかに存在している。また特開平4-187640号公報、特開平4-49240号公報および特開平5-155778号公報において分子量5,000または6,000の低分子量LPSが開示されているが、これらはいずれも熱フェノール法およびイオン交換において精製された標品であり、高分子量LPSを完全に排除する工程が施されておらず、高分子量LPSが混在していた。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】前記の通り、従来報告されている低分子量のLPSは、高分子量LPSを含む混合物であって、例えば免疫機能活性化剤等の薬剤成分として臨的に用いるには、安全性の面からも、あるいは

は薬効性能の面からも必ずしも満足のものではなかった。

【0010】この発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであり、従来のLPSに比して安全性が高く(すなわち、毒性が低く)、かつ生物活性の優れた新規なLPSを提供することを目的としている。

【0011】

【課題を解決するための手段】この発明の発明者らは、前記のような課題を解決するため、鋭意研究をおこなった結果、従来報告されているLPSとは異なる新規な低分子量LPSを発見し、しかもこの新規な低分子量LPSが、従来のLPSに比べて極めて安全性が高く、かつ生物活性も従来のLPSに比して優れていることを見出し、この発明を完成した。

【0012】すなわち、この発明は、微生物菌体から得られ、次のa)~c)の理化学的性質

a) タンパク質マーカーを用いてSDS-PAGE法で測定した分子量が5,000±2,000であり、他に染色帯を実質的に認めないこと

b) エルソン-モルガン法により測定したヘキソサミン含量が1~3個/分子量5,000であること

c) ジフェニルアミン法により測定した2-ケト-3-デオキシオクトネート含量が1~3個/分子量5,000であること

を有する低分子量リボポリサッカライドを提供する。

【0013】さらにこの発明は、微生物菌体から得られ、次のa)~f)の理化学的および生物学的性質

a) タンパク質マーカーを用いてSDS-PAGE法で測定した分子量が5,000±2,000であり、他に染色帯を実質的に認めないこと

b) エルソン-モルガン法により測定したヘキソサミン含量が1~3個/分子量5,000であること

c) ジフェニルアミン法により測定した2-ケト-3-デオキシオクトネート含量が1~3個/分子量5,000であること

d) リムラス活性が、少なくとも10EU/ngであること

e) タンパク質含量が、1%以下であること

f) 核酸含量が、1%以下であること

を有する低分子量リボポリサッカライドをも提供する。

【0014】また、この発明においては、前記の微生物が、グラム陰性の微生物であることさらにはそのグラム陰性微生物が、バントエア(Pantoea)属に属する微生物またはサルモネラ(Salmonella)属に属する微生物であることを望ましい態様としてもいる。次にこの発明について詳述する。なお、以下の説明において、百分率の表示は、特に断りのない限り、重量による値である。

【0015】この発明の低分子量LPSは、グラム陰性の微生物、例えば、バントエア属に属する微生物またはサルモネラ属に属する微生物等から得られる。

培地から菌体を集め、集めた菌体から公知の方法、例えば、熱フェノール法〔オー・ウエストファール(O. Westphal) 編、メソッズ・イン・カーボハイドレート・ケミストリー(Methods in Carbohydrate Chemistry)、第5巻、第83ページ、アカデミック・プレス(Academic Press)、1965年〕、により抽出し、さらに、陰イオン交換樹脂により精製して製造できる。すなわち、微生物の菌体を蒸留水に懸濁し、この懸濁液を蒸留水および等容量の熱フェノールの混合液に添加して攪拌し、次いで遠心分離して水層を回収し、この水層を透析してフェノールを除去し、限外濾過法により濃縮して粗LPS画分を採取し、この画分を常法の陰イオン交換クロマトグラフィー(例えば、モノQ-セファロースまたはQ-セファロースを使用する)により精製し、常法により脱塩する。

【0016】このようにして得られた精製LPSは特開平4-187640号公報、特開平4-49240号公報、特開平4-99481号公報および特開平5-155778号公報に開示される分子量5,000から6,000程度のLPSと実質的に等しい。さらに、得られた精製LPSを、例えばデオキシコール酸ナトリウム等の界面活性剤の存在下でゲル濾過し、低分子量LPSを含有する画分のみを回収し、混在する高分子量LPSを除去することによって、高度に精製されたこの発明の新規な低分子量LPSを得ることができる。この界面活性剤存在下でのゲル濾過の工程は、特開平4-187640号公報、特開平4-49240号公報および特開平5-155778号公報に開示される分子量5,000から6,000程度のLPSを更に高度に精製するためのものであり、この工程により混在する高分子量LPSが完全に排除されるのである。

【0017】以上の方法により製造されたこの発明の新規な低分子量LPSは、後記する試験例1に示すとおり、

a) タンパク質マーカーを用いてSDS-PAGE法で測定した分子量が5,000 \pm 2,000であり、他に染色帯を実質的に認めないこと

b) エルソン-モルガン法により測定したヘキソサミン含量が1~3個/分子量5,000であること

c) ジフェニルアミン法により測定した2-ケト-3-デオキシオクトネート含量が1~3個/分子量5,000であること

d) リムラス活性が、少なくとも10 EU/ngであること

e) タンパク質含量が、1%以下であること

f) 核酸含量が、1%以下であること

という理化学的および生物学的性質を有し、かつ少なくとも98%の純度を有している。しかしながら、使用目的によっては、精製の程度を低く(例えば、90%)することもできる。

【0018】この発明の新規な低分子量LPSは、免疫機能活性化作用を有する医薬品、動物用薬品等として使用することもできる。次に試験例を示し、この発明の低分子量LPSについてさらに詳しく説明する。試験例1この試験は、この発明の低分子量LPSの理化学的および生物学的性質を調べるために行った。

1) 試料の調製

実施例1および参考例1と同一の方法により低分子量LPSおよびLPSをそれぞれ調製した。

2) 試験方法

①分子量の測定

低分子量LPSおよびLPSを各々蒸留水に溶解して2 mg/mlの濃度の溶液を調製し、その10 μ gを1.5 ml容プラスチックチューブに秤取した。これとは別に、180 μ lの10% (w/v) SDS、45 μ lの5% β -メルカプトエタノール、90 μ lのCBB色素溶液、112.5 μ lの0.5 M トリス塩酸 (pH 6.8) および22.5 μ lの蒸留水を加えて調製したSDS処理液10 μ lを、前記各試料溶液に添加して十分混合し、次いで5分間沸騰水浴中に浸し、その後直ちに氷水中に浸して急冷した。

【0019】10 mlの10% (w/v) SDS、17.9 gのトリシンおよび3.03 gのトリスを1リットルの蒸留水に溶解して調製した泳動緩衝液をスラブゲル電気泳動槽(マリソル社製)に入れた。20%ポリアクリルアミドゲルを泳動槽に固定し、サンプル溝に検体を入れ、電圧を50 Vに1時間、次いで、150 Vに固定して、色素がゲルより溶出するまで泳動を継続した。泳動終了後に、銀染色キット161-0443(バイオラッド社製)により室温で銀染色を行い、挙動を確認した。

②ヘキソサミン含有量の定量

ヘキソサミン含有量を、エルソン-モルガン(Elson-Morgan)法(日本生化学会編、「生化学実験講座」、第4巻、第377~379ページ、第1版、東京化学同人出版、1976年)により次のとおり定量した。LPSを蒸留水に溶解して2 mg/mlの濃度の溶液を調製し、その100 μ lをスクリュキャップ付きスピッツ(イワキガラス社製)に秤取し、これに100 μ lの8 N HClを添加して110 $^{\circ}$ Cで16時間加熱し、のち4 N NaOHを約200 μ l添加してpHを7に調整した。その100 μ lを秤取し、別のスクリュキャップ付きスピッツに入れ、200 μ lの試薬Aを加え、105 $^{\circ}$ Cで1.5時間加熱し、流水で冷却した。次いで、その100 μ lを分取し、670 μ lの96%エタノールを加え、更に67 μ lの試薬Bを加え、室温で1時間放置し、535 nmにおける吸光度を測定した。検量線作成用標準試料としては0~800 μ g/mlのN-アセチルグルコサミン(和光純薬社製)を用いた。

試薬A: 75 μ lのアセチルアセトンと2.5 mlの1.25 N炭酸ナトリウムとの混合液

試薬B: 1.6gのp-ジメチルベンズアルデヒド、30mlの濃塩酸および30mlの96%エタノールの混合液。

③KDO含量の定量

KDO含有量をジフェニルアミン法〔アナリティカル・バイオケミストリー(Aalytical Biochemistry)、第58巻、第1号、第123~129ページ、1974年〕により次のとおり定量した。

【0020】500mgのジフェニルアミン(和光純薬社製)、5mlのエタノール(和光純薬社製)、45mlの氷酢酸(和光純薬社製)、50mlの濃塩酸(和光純薬社製)を混合してKDO検出試薬を調製した。その500μlに、0.50mg/mlの濃度で各試料を含ませ

$$S = A_{420} - A_{470} + A_{630} - A_{650} \quad (1)$$

$$X = (0.5 \times S_1 \times \text{LPS 1モルの分子量}) / (0.5 \times S_2 \times 10^6) \quad (2)$$

④リムラス活性の測定

リムラス活性とは、1968年にレヴィンにより創案されたカプトガニ血球抽出液と発色合成基質を用いたエンドトキシン定量法であるリムラステスト(鈴木郁生編、「医薬品の開発第14巻、医薬品の品質管理及び試験法」、第227~243ページ、廣川書店、1990年)で陽性を呈することを意味し、このリムラステストはLPS検出法として知られている。標準品として、345pg/EUのイー・コリ(E. coli) 0111:B4を用いてトキシカラシシステム(生化学工業社製)を使用して測定した。

⑤タンパク質含量

タンパク質含量を、ローリー法〔ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(Journal of Biological Chemistry)、第193巻、第65ページ、1951年〕により測定した。

⑥核酸含量

核酸含量を、OD(260nm-300nm)での測定値(1OD=40μg)から定量した。

⑦純度

純度(%)は、次式により算出した。

$$\text{【0022】純度} = \left[\frac{\text{乾燥収量} - (\text{タンパク質含量} + \text{核酸含量})}{\text{乾燥収量}} \right] \times 100$$

3) 試験結果

①分子量

分子量測定の結果は、図1に示すとおりである。図1は、SDS-PAGE泳動図であり、図中レーン1は同時に泳動させたタンパク質およびペプチド分子量マーカー[94kD、67kD、43kD、30kD、20.1kD、17.2kD、14.6kD、14.4kD、8.24kD、6.38kD、2.56kD(ファルマシア社製)]、レーン2、3および4はLPS(20μg、5μgおよび1.25μg)、レーン5、6、7および8は低分子量LPS(20μg、5μg、1.25

* 250μlの水溶液を混合し、100℃の沸騰水浴中で30分間加熱し、のち恒温水(24~25℃)中で30分間冷却し、分光光度計(日立製作所製。モデルU2010)により420、470、630、650nmでの吸光度を測定した(測定値を各々A420、A470、A630、A650と記載する)。標準試料として、0.5μmolの濃度のKDOアンモニウム塩(シグマ社製)水溶液250μlを使用した。

【0021】検体試料および標準試料の4種の測定値から、式(1)によりS値を求め、検体試料および標準試料のS値をそれぞれS₁、およびS₂とした。次いで式(2)によりKDOのモル数Xを算出した。

μgおよび0.31μg)であり、図の縦軸は、分子量を示す。

【0023】一般的に糖鎖を有する物質を電気泳動した場合、レーン当たりのサンプル量が過剰の時には染色帯が幅広くなり、見かけの分子量範囲が広がる。図1のSDS-PAGEではレーン5から8は、同一試料の低分子量LPSの量を変更して泳動したものであるが、試料の泳動量が増えるに従い染色帯の幅が広がっている。従って、正確な分子量を調べる目的では、1μg程度の量が適当であり、レーン8が相当する。なお、レーン2およびレーン5は、高分子量のLPSの存在を確認するために多量の試料を泳動させたものである。

【0024】低分子量LPSの分子量(レーン8より計算)は、レーン1のサイズマーカーから計算して染色帯の中心値で5kDa、染色帯幅の範囲は4kDaから7kDaであった。また、レーン5では、20μgの低分子量LPSを泳動させたにもかかわらず、レーン2のように高分子量LPSは全く認められなかった。以上の結果から、この発明の低分子量LPSの分子量は、5,000±2,000であり、高分子量LPSが完全に除去されていることが判明した。

②ヘキソサミン含量

この発明の低分子量LPSのヘキソサミン数は2個/分子量5,000であった。

③KDO含量

この発明の低分子量LPSに含まれるKDOは2.4個/分子量5,000であった。

④リムラス活性

この発明の低分子量LPSのリムラス活性は43.5EU/ngであり、これに対して、参考例1と同様の方法で調製した従来のLPSのリムラス活性は8.4EU/ngであった。

⑤タンパク質含量

この発明の低分子量LPSのタンパク質含量は、0.6

8%以下であった。

⑥核酸含量

この発明の低分子量LPSの核酸含量は0.50%以下であった。

⑦純度

この発明の低分子量LPSの純度は98%以上であった。

【0025】なお、微生物および製造法を変更して試験したが、ほぼ同様な結果が得られた。試験例2

この試験は、この発明の低分子量LPSの急性毒性を調べるために行った。

(1) 試料の調製および試験方法

実施例1と同一の方法で調製した低分子量LPSおよび参考例1と同一の方法で調製したLPSの毒性を、7週齢のC3H/Heマウス（日本チャールス・リバー社から購入）を用いて試験した。1群4匹からなるマウス群に、各試料を生理食塩水に溶解し、1匹あたり5.0、10、20および40mg/kgの割合で静脈内に投与した（ただし40mg/kgの投与は低分子量LPSのみ）。投与後72時間マウスの生死を観察した。

(2) 試験結果

この試験の結果は表1に示すとおりである。表1から明らかなように、静脈内投与の場合、この発明の低分子量LPSではいずれの投与量においてもマウスの死亡例は認められず、LD₅₀は40mg/kg以上であったが、LPSでは10および20mg/kgの投与量で全数が死亡し、LD₅₀は6.0～8.6mg/kgであった。なお、微生物の種類および低分子量LPSの製造法を変更して試験したが、ほぼ同様な結果が得られた。

【0026】

【表1】

試料	静脈内投与			LD50
	投与量 (mg/kg)	死亡数	死亡率 (%)	
LPS	5	0/4	0	7.1 (6.0-8.6)
	10	4/4	100	
	20	4/4	100	
低分子量 LPS	5	0/4	0	>40
	10	0/4	0	
	20	0/4	0	
	40	0/4	0	

【0027】試験例3

この試験は、この発明の低分子量LPSを試験例2よりも多量に投与した場合の急性毒性を調べるために行った。

(1) 試料の調製および試験方法

試験例2と同一の低分子量LPSを1匹あたり40、80および160mg/kgの割合で静脈内に投与したと、およびLPSを1匹あたり5.0、または10mg/kgの割合で静脈内に投与したことを除き、試験例2

と同一の方法により試験した。

(2) 試験結果

この試験の結果は、表2に示すとおりである。表2から明らかなように、LPS5.0mg/kgの投与量で25%が、また10mg/kgの投与量では75%が死亡した。これに対して、低分子量LPSにおいては40mg/kgの投与量で死亡せず、80および160mg/kgの投与量では、100%が死亡した。前試験例2とこの試験例3の結果から、LD₅₀を算出すると表3のとおりである。表3から明らかなように、低分子量LPSのLD₅₀の値はLPSのそれに比べて、静脈内投与では約8倍であった。

【0028】これらの結果は、LPSの分子量の相違が毒性に影響を及ぼすことを示しており、低分子量LPSは、従来のLPSに比して極めて毒性の低いことが判明した。

【0029】。

【表2】

試料	静脈内投与			LD50
	投与量 (mg/kg)	死亡数	死亡率 (%)	
LPS	5	1/4	25	7 (2.5-20)
	10	3/4	75	
低分子量 LPS	40	0/4	0	57 (47-88)
	80	4/4	100	
	160	4/4	100	

【0030】

30 【表3】

試料	毒性 (LD50) (mg/kg)	
	静脈内投与	
LPS	7.1 (6.8-8.6) 7.0 (2.5-20)	
低分子量LPS	57 (47-68)	

【0031】試験例4

この試験は、この発明の低分子量LPSのTNF産生効果を確認するために行った。各群3匹の7週齢の雄C3H/Heマウス（日本チャールズ・リバー社より購入）の尾静脈に、1匹あたり0.1、1.0、または10μgの実施例1と同様の方法で製造した低分子量LPS、または参考例1と同じ方法で得られたLPSを含む生理食塩水0.2mlを注射し、その1時間後に採血し常法により血清を分離した。

【0032】このようにして得られた各血清中のTNF活性を、L929細胞に対する毒性に基づく方法で測定した。すなわち、L929細胞を5%ウシ胎児血清を含有するMEM培地で8×10⁴個/100μlの濃度に調製し、これを26℃で培養し、その培養液を

づつまき、37℃で2時間、5%CO₂存在下で培養した。その後アクチノマイシンDを1μl/mlとなるように添加し、MEM培地で段階希釈した血清試料または陽性対照ヒトTNF-α(旭化成社製)を50μlづつ添加し、更に同じ条件で18時間培養した。培地をアスピレーターで取り除いた後、37℃のPBSで洗浄し死細胞を完全に取り除き、0.1%クリスタルバイオレットを含む1%メチルアルコール溶液を加えて生細胞を染色した。この染色度をOD(590nm)での吸光度を指標として測定し、陽性対照として用いたTNF-αの希釈率と吸光度との関係をもとにTNF活性を算定した。

【0033】その結果は、表4に示すとおりであった。表4においてTNF活性は各群3匹の平均値である。この結果から、この発明の低分子量LPSのTNF産生効果は、参考例1の方法で得られる従来のLPSのそれを上回ることが明らかとなった。

【0034】

【表4】

試料	LPS量 (μg/匹)	TNF活性 (単位/ml)
LPS	0.1	0.5
	1.0	2.1
	10	15.2
低分子量LPS	0.1	4.5
	1.0	13.2
	10	28.3

【0035】参考例1

トリプトン(ディフコ社製)10g、酵母エキス(ディフコ社製)5g、NaCl(和光純薬工業社製。特級)10gを蒸留水1リットルに添加し、NaOHでpHを7.5に調整し、オートクレーブで滅菌し、別に滅菌したグルコース(和光純薬工業社製。特級)を0.1%の割合で添加した培地(以下L-肉汁培地と記載する)100mlの入った500ml容の坂口フラスコに、-80℃で保存されているバントエア・アグロメランス(Pantoea agglomerans)保存菌株から単一コロニーを分離して接種し、35℃で1夜振とう培養し、そのまま全量を1,000mlのL-肉汁培地の入った3リットル容の坂口フラスコに接種し、同様に培養した。

【0036】さらに、7リットルのL-肉汁培地の入った10リットル容の卓上型ファーマンター(丸菱バイオエッジ社製)に培養した菌体を接種し、同条件で通気培養し、のち集菌し、約70gの湿菌体を回収し、これを凍結保存した。凍結保存菌体約70gを500mlの蒸留水に懸濁し、500mlの90%熱フェノールを添加して65~70℃で20分間攪拌し、冷却し、10,000G、4℃で20分間遠心処理し、水層を回収した。フェノール層を更に1回前記と同一の操作を反復し、回収した2回の水層を合し、1夜透析してフェノールを除去し、透析内液を限外濾過装置(アドヴァンテック・ト

トーオフ膜により2気圧の窒素ガス下で限外濾過濃縮した。

【0037】得られた粗LPS凍結乾燥物を蒸留水に溶解し、フィルター滅菌し、緩衝液を添加し、陰イオン交換クロマトグラフィー(ファルマシア社製。Q-セファロース・ファースト・フロー)にかけ、10mMトリス-HCl(pH7.5)および10mMのNaClを含む緩衝液で試料溶液をカラムに通液し、200~400mMNaCl/10mMトリス-HCl(pH7.5)でリムラス活性画分を溶出させた。この溶出液を前記と同一条件で限外濾過して脱塩および濃縮し、凍結乾燥し、約70gの湿菌体から約300mgの精製LPSを得た。

【0038】以下、実施例を示してこの発明をさらに詳細かつ具体的に説明するが、この発明は以下の例に限定されるものではない。

【0039】

【実施例】

実施例1

20 参考例1と同一の方法で得た精製LPS100mgを5mg/mlの濃度で可溶性緩衝液[3%デオキシコール酸ナトリウム(和光純薬社製)、0.2M塩化ナトリウム、5mMEDTA-2Naおよび20mMトリス-塩酸からなり、pH8.3]に溶解し、精製LPS溶液20mlをセファクリルS-200HRカラム(ファルマシア社製)の上部に静かに重層し、溶出緩衝液[0.25%デオキシコール酸ナトリウム(和光純薬社製)、0.2M塩化ナトリウム、5mMEDTAおよび10mMトリス-塩酸からなり、pH8.3]により流速16ml/時で800ml(50時間)溶出した。

【0040】ペリスタポンプPI(ファルマシア社製)を用いて流速を制御しながら、得られた溶出液を、フラクションコレクター(アドバンテック社製。SF2120)により分画し、最初の240ml(24フラクション分)を廃棄し、その後10ml/フラクションで80フラクションまで分画した。溶出した各画分について原液または希釈液でフェノール/硫酸法(福井作蔵、「還元糖の定量法・第2版」、第50~52ページ、学会出版センター、1990年)により糖の定量を行い、溶出状態を調べた。得られた溶出状態の結果から、LPSの存在が予想される分画(フラクション30~60)のうち、フラクション37~55の各フラクション0.5mlを用いてSDS-PAGEを行い、LPSの分画パターンを調べた。その結果、フラクション45~55は低分子量(分子量約5kD)LPSのみが認められ、フラクション37~44は高分子分量および低分子量の両方のLPSが認められたので、フラクション45~55の低分子量LPS分画を次のとおりさらに精製した。

【0041】各画分を混合して凍結乾燥し、エタノールに懸濁し、遠心分離によりエタノールに可溶なデオキシ

コール酸を除去し、低分子量LPSを不溶性画分に回収した。低分子量LPS画分のエタノール処理をさらに2回反復し、デオキシコール酸を除去し、次に70%エタノールに再度懸濁し、遠心分離で緩衝液成分を除去し、この操作をさらに3回反復し、低分子量LPSを不溶性画分に回収し、凍結乾燥し、精製した低分子量LPSを約20mg得た。

実施例2

トリプトン(ディフコ社製)5g、リン酸二水素カリウム1.6gおよび塩化ナトリウム8gを精製水1,000mlに溶解し、121℃で15分間滅菌した(以下これを基礎培地という)。基礎培地100mlに40%塩化マグネシウム溶液10mlおよび0.4%マラカイトグリーン溶液3mlを無菌的に添加し、これをマグネシウム-マラカイトグリーン培地とした。

【0042】マグネシウム-マラカイトグリーン培地100mlの入った500ml容の坂口フラスコに、サルモネラ・ミネソタ(*Salmonella minnesota*)保存菌株から単一コロニーを分離して接種し、35℃で1夜振とう培養し、そのまま全量を1,000mlのマグネシウム-マラカイトグリーン培地の入った3リットル容の坂口フラスコに接種し、同一条件で培養した。

【0043】さらに、7リットルのマグネシウム-マラカイトグリーン培地の入った10リットル容の卓上型 fermenter (丸菱バイオエンジニアリング社製)に培養した菌体を接種し、同一条件で通気培養し、のち集菌し、約50gの湿菌体を回収し、これを凍結保存した。凍結保存菌体約50gを500mlの蒸留水に懸濁し、500mlの90%熱フェノールを添加して65~70℃で20分間攪拌し、冷却し、10,000G、4℃で20分間遠心処理し、水層を回収した。フェノール層をさらに1回前記と同一の操作で処理した。2回の水層を合し、1夜透析してフェノールを除去し、透析内液を限外濾過装置

(アドヴァンテック・トーヨー社。UK-200)を用いて分子量20万カットオフ膜により2気圧の窒素ガス下で限外濾過濃縮をした。

【0044】得られた粗LPS凍結乾燥物を蒸留水に溶解し、フィルター滅菌し、緩衝液を添加し、陰イオン交換クロマトグラフィー(ファルマシア社製。Q-セファ

ローズ・ファースト・フロー)にかけ、10mMトリス-HCl(pH7.5)および10mMのNaClを含む緩衝液で試料溶液をカラムに通液し、200~400mMNaCl/10mMトリス-HCl(pH7.5)でリムラス活性画分を溶出させた。この溶出液を前記と同一条件で限外濾過して脱塩および濃縮し、凍結乾燥し、約50gの湿菌体から約210mgの精製LPSを得た。

【0045】この精製LPS80mgを実施例1と同一の方法で、3%デオキシコール酸ナトリウムを含有する可溶性緩衝液に溶解し、セファクリルS-200HRカラム(ファルマシア社製)で展開し、低分子量LPSのみを含有する画分を回収し、凍結乾燥後、エタノールに懸濁し、遠心分離によりデオキシコール酸等の緩衝液成分を除去し、凍結乾燥し、約5mgの低分子量LPSを得た。

【0046】この低分子量LPSの分子量、KDO数およびヘキサミン数を前記試験例1と同一の方法で測定した結果、それぞれ6,000、2.01個/分子量6,000、および2.8個/分子量6,000であった。なお、参考のため図2に、サルモネラ・ミネソタ菌株から精製された低分子量LPSのSDS-PAGE図を示す。図中レーン1は蛋白質およびペプチドマーカー[94kD、67kD、43kD、30kD、20kD、17.2kD、14.6kD、14.4kD、8.24kD、6.38kDおよび2.56kD(ファルマシア社製)]、レーン2、3および4はデオキシコール酸ナトリウム存在化でのゲル濾過前の精製LPS(20μg、5μg、および1.25μg)、レーン5、6、7および8は、低分子量LPS(20μg、5μg、1.25μg、および0.31μg)である。

【0047】

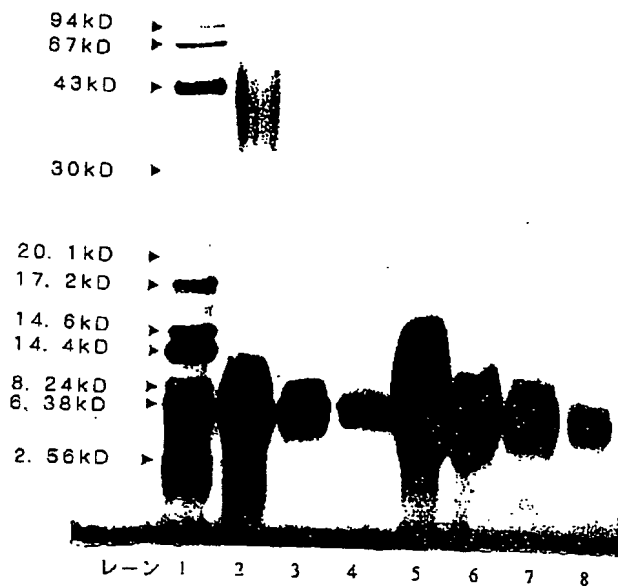
【発明の効果】以上詳しく説明したとおり、この発明により、医薬品等として使用し得る安全性が極めて高く、かつ生物活性の高い低分子量LPSが提供される。

【図面の簡単な説明】

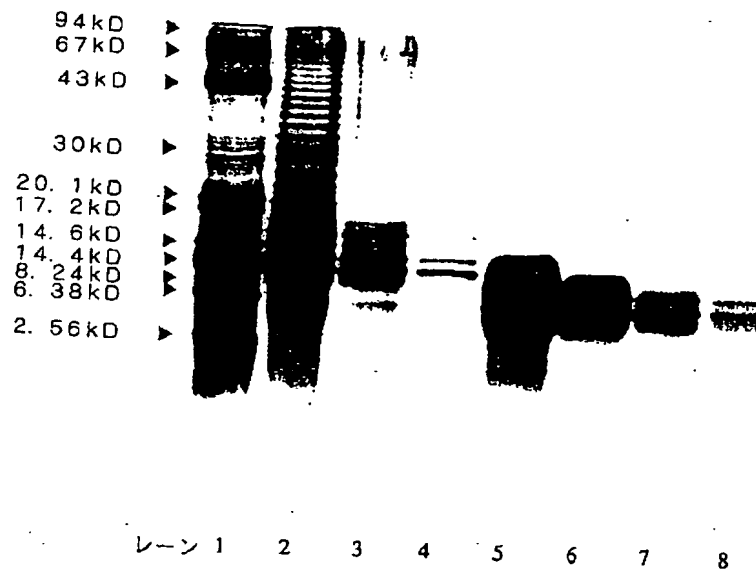
【図1】各LPS試料のSDS-PAGE図である。

【図2】各LPS試料のSDS-PAGE図である。

【図1】



【図2】



【手続補正書】

【提出日】平成7年2月3日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0008

【補正方法】変更

【補正内容】

【0008】しかしながら、従来のLPSは、安全性の面から、臨床応用への問題点が指摘されてもいる（日本組織培養学会編、「細胞成長因子part II」、第12

1ページ、朝倉書店、1987年）。一方、細菌の細胞壁からLPSを精製する方法については、従来フェノール-水抽出法〔オー・ウェストファール(O. Westphal)編、メソッズ・イン・カーボハイドレート・ケミストリー(Methods in Carbohydrate Chemistry)、第5巻、第83ページ、アカデミック・プレス(Academic Press)、1965年〕、トリクロル酢酸抽出法〔エー・エム・スタブ(A.M. Staub)編、メソッズ・イン・免疫ロジー・アンド・免疫ケミストリー(Methods in Immunology a

nd Immunochimistry)、第1巻、第28ページ、アカデミック・プレス(Academic Press)、1967年]、EDTA抽出法[ジャーナル・オブ・バイオリジカル・ケミストリー(Journal of Biological Chemistry)、第243号、第6384ページ、1968年]等が知られているが、このようにして得られたLPSは、デオキシコール酸ナトリウム等の界面活性剤の存在下で、更に分子量約20,000程度のサブユニットに解離することが報告されている(本間遜他編、「細菌内毒素」、第229ページ、講談社、1973年)。一方、分子量20,000以上のLPSを含まず、分子量5,000程度の極めて低分子量のLPSのみを取得する方法については、*

*従来報告されていなかった。例えば特開平4-99481号公報には、SDS-PAGEの図が示されているが、分子量6,000付近の染色帯に加えて、分子量30,000以上の染色帯が明らかに存在している。また特開平4-187640号公報、特開平4-49240号公報および特開平5-155778号公報において分子量5,000または6,000の低分子量LPSが開示されているが、これらはいずれも熱フェノール法およびイオン交換において精製された標品であり、高分子量LPSを完全に排除する工程が施されておらず、高分子量LPSが混在していた。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶

C12R 1:01)

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所